

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-317092

(43)Date of publication of application : 26.12.1988

---

(51)Int.Cl. C12P 7/66

//(C12P 7/66

C12R 1:01 )

---

(21)Application number : 62-151059

(71)Applicant : MITSUBISHI GAS CHEM CO INC

(22)Date of filing : 19.06.1987

(72)Inventor : URAGAMI SADAJI  
KOGA HIROMI

---

### (54) PRODUCTION OF COENZYME Q10

#### (57)Abstract:

PURPOSE: To readily, efficiently and stably obtain a coenzyme Q10 useful in a medicine such as heart function-accentuating agent, feed additives, etc., by extracting a bacterium cell obtained by cultivating a coenzyme Q10 producing bacterium belonging to the genus *Oligomonas*.

CONSTITUTION: A bacteria cell is separated and selected from a soil, etc., in a culture medium containing methanol to afford *Oligomonas methanolica* strain exhibiting the following bacteriological and physiological properties: Shape and size of the cell: cocci or short rods, wide, 0.5W0.8  $\mu$  m, length, 0.5W1.5  $\mu$  m; Gram negative; capable of rearing and propagating in alkaline conditions; capable of reducing nitrate; capable of assimilating glucose and methanol, etc. Then the strain is aerobically cultivated in a culture medium containing about 6wt.% methanol, peptone, etc., at 20W42° C, pH7W10 and 0.5W20ppm dissolved oxygen concentration. Then a bacterium cell is separated from the culture medium and dried and the resultant dried bacterium cell is heated with ethanol, etc., at 50W90° C for about 1hr to provide an extract, which is fractionated with silica gel, etc., and purified to liberate the aimed coenzyme Q10.

---

### LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑬ 日本国特許庁(JP)

⑭ 特許出願公開

## ⑯ 公開特許公報(A) 昭63-317092

⑰ Int. Cl.<sup>4</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑱ 公開 昭和63年(1988)12月26日  
 C 12 P 7/66 A-7236-4B  
 //C 12 P 7/66  
 C 12 R 1:01 審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑲ 発明の名称 補酵素Q<sub>10</sub>の製造法

⑳ 特 願 昭62-151059

㉑ 出 願 昭62(1987)6月19日

㉒ 発 明 者 清 上 貞 治 新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱瓦斯化学株式会社新潟研究所内

㉓ 発 明 者 木 我 浩 美 新潟県新潟市太夫浜字新割182番地 三菱瓦斯化学株式会社新潟研究所内

㉔ 出 願 人 三菱瓦斯化学株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

㉕ 代 理 人 弁理士 小 堀 貞 文

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

補酵素Q<sub>10</sub>の製造法

## 2. 特許請求の範囲

オリゴメチレン系に属する補酵素Q<sub>10</sub>生産細菌を培養して菌体を得、得られた菌体から補酵素Q<sub>10</sub>を分離、回収することを特徴とする補酵素Q<sub>10</sub>の製造法

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、補酵素Q<sub>10</sub>の製造法に関し、さらに詳細には、微生物を用いた補酵素Q<sub>10</sub>の製造法に係わる。

補酵素Q<sub>10</sub>は、生体内の末端呼吸系の電子伝達体として重要な役割を果たし、心臓虚脱充灌剤、虚脱無力症治療剤、肺気腫治療剤、再生不良性貧血治療剤および円形脱毛症治療剤などの医薬品ならびに飼料添加剤などとして有用な化合物とし

て知られている。

[従来の技術、発明が解決しようとする課題点]

従来、補酵素Q<sub>10</sub>は、動物および植物などのそれぞれの組織から抽出され、さらに、精製することにより製造されており、品質の均一性に問題があり、また、原料の供給が不安定であった。

このような欠点を回避するための一方法として、最近では、微生物を培養して得られた菌体から補酵素Q<sub>10</sub>を抽出する方法が知られている。

しかしながら、微生物の補酵素Q<sub>10</sub>の生産性は、実用に供するには、まだ、充分ではなく、補酵素Q<sub>10</sub>の生産性の大きい微生物の発見が期待されている。

本発明は、微生物を使用し、効率よく補酵素Q<sub>10</sub>を製造する方法を提供することを目的とする。

[問題を解決するための手段、作用]

本発明者らは、補酵素Q<sub>10</sub>を多量に生産する菌株を見出すべく研究を重ねた結果、オリゴメチレン系に属する菌株が、その菌体内に多量の補酵素Q<sub>10</sub>を多量に生産、蓄積することを見出し、本発明に

本発明のアルカリ性メタノール還元性細菌のうち、代表的な菌株である0-3(農工研菌第9280号)、0-75(農工研菌第9281号)および0-100(農工研菌第9282号)のそれぞれの化学的性質を示す。

化学的性質:

30℃で3日間培養。

### (3) 生理学的性質

### ⑮ 生育の範囲

5℃、37℃では生育しない。

## + (男): 弱く生きている

ビオチンを要求する。

土壤

✓

窒素源としては、たとえば、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機窒素化合物および／または、たとえば、尿素、コーン・スティア・リカー、カゼイン、ペプトン、酵母エキス、肉エキスなどの有

また、培養液の保存酸素濃度には特に制限はないが、通常は、0.5~20ppm が好ましい。そのため、通気量を調節したり、攪拌したり、通気ガ

## 特開昭63-317092 (5)

スとして酸漬もしくは酸漬と空気との混合ガスを使用したり、また、培養槽内の圧力を高めるなどの手段が採用される。また、培養方式は、固分培養または連続培養のいずれでもよい。

培養槽としてアンモニア塔を使用した場合には、培養期間中にアンモニアが菌体生産のために消費されて培養液のpHが低下する。この場合に、培養液のpHを所定の値に保つために、アンモニア、苛性カリおよび苛性ソーダなどのアルカリを添加するが、アンモニアを添加することが好ましい。

このようにして、細菌を培養したのち、菌体を培養液から分離する。分離には通常の固液分離手段が採用される。すなわち、固液分離手段としては、たとえば、培養液そのものをそのまま遠心分離するとの手段、培養液中に凍結菌よりも多い量の微生物を凍結剤として加えたり、または、プレコートすることにより培養液から菌体を凍結分離するとの手段、培養液に種々の凝集剤を加えて菌体を凝集させて、この凝集菌体を凍結もしくは遠心分離により培養液から分離するとの手段、

培養液のpHを5以下にすることにより、または、pHを5以下にしさらに50～100℃で加熱することにより菌体を凝集させて、この凝集菌体を凍結もしくは遠心分離により培養液から分離するとの手段などを適用し得る。

分離されたままの菌体、または、たとえば、噴霧乾燥などによる乾燥菌体から補酵素 $Q_{10}$ を抽出し、この補酵素 $Q_{10}$ は必要に応じてさらに精製に付される。

補酵素 $Q_{10}$ の分離、抽出および精製は、補酵素 $Q_{10}$ に適用されている通常の分離抽出法および精製法によって行なうことができる。すなわち、たとえば、エタノール、メタノールもしくはアセトンに菌体を懸濁させて、50～90℃で1時間加熱して抽出して抽出液を得る。または、まず、メタノール、水酸化ナトリウムおよびジロクロールの混合物を用いて、菌体中のりん脂質などのけん化性物質をけん化してけん化液を得る。これらの抽出液もしくはけん化液から、たとえば、 $n$ -ヘキサンのような有機溶媒によって補酵素 $Q_{10}$ を抽出し

て抽出物を得る。ついで、この抽出物から、たとえば、ハイパーラスポリマーのような多孔性合成樹脂、シリカゲルおよびフロリジルなどを用いて、補酵素 $Q_{10}$ を分別、単離し、精製する。

菌体から得られた補酵素 $Q_{10}$ の同定、定量には、一般に、高速液体クロマトグラフィー、元素分析、融点測定、赤外線吸収スペクトル、紫外線吸収スペクトル、核磁気共鳴スペクトルおよび質量分析などの手段がそれぞれ用いられる。

## 〔実施例〕

実施例によって本発明をさらに具体的に説明する。なお、本発明は、実施例に限定されるものではない。

## 実施例1

オリゴナス メタノリカの菌体の分離

土壌サンプル約0.5～1gを殺菌水10mlに無菌的に入れ、この懸濁液1mlをメタノール含有寒天平板培地に接種がば一様になるように入れ、水分をこの寒天培地に吸収させたのち、28℃で約7日間静置培養を行なった。この寒天培地に生

殖したコロニーの一部分をさらにメタノール含有寒天平板培地に培養して得られた単一コロニーを、メタノール含有寒天斜面培地に接種して培養して、オリゴナス メタノリカ 0-3、同 0-75 および同 0-100 のそれぞれを得た。

補酵素 $Q_{10}$ の製造

純水1gあたり、 $(NH_4)_2SO_4$  3g、 $KH_2PO_4$  1.8g、 $Na_2HPO_4$  2.1g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2g、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  30mg、 $FeCl_3 \cdot H_2O \cdot xH_2O$  30mg、 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  50g、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  5mg、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.5mg、 $Na_2CO_3$  2.5g、ビオチン2mgおよびメタノール8mlを溶解し、pH9.0に調整した培地（以下 培地Aと記す）30mlを100ml容三角フラスコに分注し、120℃で20分間殺菌した。寒天20g/ℓを添加したメタノール含有寒天培地（ $Na_2CO_3$ を含まない培地を120℃で20分間殺菌し、これに別に殺菌した10重量%  $Na_2CO_3$ 水溶液を培地10mlあたり0.25ml添加して作成した）で30℃、3日間培養したオリゴナス メタノリカ 0-100（微生物第9282号）の1白金耳を100ml容三角フラスコ中の培地Aに

特開昭63-317092 (6)

接種し、30℃でロータリー・シェーカーで回転数220回/分の回転無菌培養を行なった。この培養液を種母液とした。

工業用水1gあたり、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4.5g、 $\text{FeC}_2\text{H}_3\text{O}_7 \cdot \text{XH}_2\text{O}$  39mg、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  90mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  15mg、 $\text{NaCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  15mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1.8mg、 $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1.0mg、 $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.0mg、 $\text{H}_3\text{PO}_4$  1.0mg、 $\text{NaCl}$  50mg、 $\text{K}_2\text{I}$  1.0mgおよびビオチン80μgを含む塩基（塩基B）15gを30g容培養樽に入れ、殺菌後、ブクモニア水でpH9.0に調整し、メタノール40mlおよび酵母液200mlをそれぞれ添加した。細菌が増殖するに従って、培養液中のメタノール濃度が低下したが、このメタノール濃度をガスクロマトグラフィーで分析し、培養液中のメタノール濃度が0.1~0.2重量%になるようにメタノールを補給した。培養温度30℃、培養液のpH9.0、撹拌機の回転数（撹拌羽根の半径71mm）900回/分および通気量1vvmで通気（空気を供給）撹拌培養を行なったところ、世代時間

が約4時間で細菌が増殖した。培養を開始してから、48時間後に、培養液を遠心分離し、得られた菌体を凍結乾燥して乾燥固体90gを得た。

この乾燥菌体から補酵素 $\text{Q}_{10}$ を、イソプロパノール濃度が90容量%のイソプロパノール水溶液で抽出し、ついで、ヘキサン転溶を行ない、得られたヘキサン溶液中の還元型補酵素 $\text{Q}_{10}$ を兩相液で酸化した後、このヘキサン溶液について、高速液体クロマトグラフィーで補酵素 $\text{Q}_{10}$ を同定し、その含量を測定した。その結果から、乾燥固体1gあたり1.60mgの補酵素 $\text{Q}_{10}$ が得られたことになる。

〔発明の効果〕

本発明によれば、工業生産により安定して容易に入手し得る物質をも原料として使用することができ、さらに、細菌を使用して、補酵素 $\text{Q}_{10}$ を容易に、効率よく、しかも、安定して製造することが可能となる。

また、特に、本発明における細菌は、好アルカリ性細菌なので培養における雑菌による汚染が著

しく低減される。

特許出願人 三菱瓦斯化学株式会社  
代表者 長 野 和 吉  
代 理 人 弁 理 士 小 園 貞 次